

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation 6 : B01D 69/02, 61/14, 67/00, B01J 20/32, B01D 15/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/33683 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. September 1997 (18.09.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/01225		(81) Bestimmungstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 11. März 1997 (11.03.97)		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 196 09 479.8 11. März 1996 (11.03.96) DE			
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungstaaten ausser US</i>): GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).			
(72) Erfinder; und (73) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): ANSPACH, Birger [DE/DE]; (DE). PETSCHE, Dagmar [DE/DE]; (DE). BEESKOW, Thomas [DE/DE]; (DE). DECKWER, Wolf-Dieter [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).			
(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).			

(54) Title: ENDOTOXIN-SPECIFIC MEMBRANES

(54) Bezeichnung: ENDOTOXIN-SPEZIFISCHE MEMBRANEN

(57) Abstract

The invention concerns a microfiltration membrane for separating endotoxins from liquid media, in particular water, protein solutions or parenteralia. The microfiltration membrane is characterized by covalently bonded ligands for endotoxins, the ligands being carried by a polymer which is applied to the membrane.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Mikrofiltrationsmembran zur Abtrennung von Endotoxinen aus flüssigen Medien, insbesondere Wasser, Proteinlösungen oder Parenteralien, die durch kovalent gebundene Liganden für Endotoxine, wobei die Liganden von einem Polymeren getragen werden, das auf der Membran aufgebracht ist, gekennzeichnet ist.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Oesterreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Endotoxin-spezifische Membranen**Beschreibung**

Die Erfindung betrifft eine Mikrofiltrationsmembran zur Abtrennung von Endotoxinen aus flüssigen Medien sowie die Verwendung dieser Mikrofiltrationsmembran.

Endotoxine sind Lipopolysaccharide aus der äußeren Zellmembran Gram-negativer Bakterien, die als Pyogene wirken. Aufgrund der Allgegenwärtigkeit von Bakterien sind auch Endotoxine ubiquitär. Sie können im Gegensatz zu Bakterien jedoch nicht durch Standard-Methoden wie Sterilfiltrieren oder Autoklavieren entfernt bzw. unschädlich gemacht werden (1). Aus diesem Grund ist steril nicht gleichbedeutend mit Endotoxin-frei. Besonders kritisch ist die Anwesenheit von Endotoxinen in Injektions- bzw. Infusionslösungen (Parenteralia), da sie intravenös appliziert bereits in Mengen von 1 ng pro kg Körpergewicht fiebererregend wirken. Die Symptomatik reicht bei entsprechend hoher Dosierung (z. B. durch großvolumige Parenteralia) bis zu schwerem Schock und Tod (2, 3). Daher schreiben fast alle Pharmacopöen neben der Keimfrei-

heit strenge Endotoxin-Höchstwerte vor: z. B. 0,2 EU pro mg Chloramphenicol zur Injektion oder nur 0,003 EU pro Heparin-Unit (4). Die Erfüllung dieser Forderungen bereitet in der Praxis einige Schwierigkeiten. Insbesondere die Produktion biologischer Arzneimittel kann nicht in allen Schritten Endotoxin-frei erfolgen. Als Endotoxin-Quellen kommen hauptsächlich in Frage:

- Rohstoffe wie Plasma oder Gewebe, die bereits Bakterien-kontaminiert sein können.
- Bei rekombinannten Produkten ist mit dem Eintrag von Host-spezifischen Endotoxin zu rechnen.
- Bakterielle Kontamination von Geräten, Filtern oder Hilfsstoffen während der Herstellung.

Die für thermostabile Wirkstoffe übliche Hitzedekontamination (30 Minuten bei 250 °C) ist für die Präparate ebenso wenig geeignet wie Behandlung mit Säuren, Laugen oder stark oxidierenden Agenzien (H_2O_2) (1).

Beim Einsatz von Aktivkohle oder Tiefenfiltern wie ZETA PLUS sind häufig merkliche Produktverluste zu verzeichnen, so daß ihre Anwendung auf die Wasseraufbereitung beschränkt bleibt (5, 6).

Die Ultrafiltration hat als sehr schonende Methode große Popularität auf dem Gebiet der Endotoxin-Entfernung erlangt. Hierbei wird i. a. mit cut-offs von 10000 oder 5000 gearbeitet, um auch monomere Bestandteile (MW ca. 14000) wirkungsvoll abzutrennen, die neben hochmolekularen Aggregaten (bis zu mehreren Millionen Molekulargewicht) vorliegen. Trotzdem treten immer wieder Probleme mit niedermolekularen Spaltstücken auf, die ebenfalls pyrogen wirken (z. B. Lipid A). Das betrifft vor allem die Hämodialyse: Obwohl die Dialysepuffer ultrafiltriert werden, entwickeln z. B. in den USA jährlich 400000 Hämodialyse-Patienten septische Symptome (7). - Die Notwendigkeit der kleinen cut-offs

beschränkt die Anwendung der Ultrafiltration zudem auf die Dekontaminierung niedermolekularer Substanzen (8).

Im Fall von hochmolekularen Produkten wie Pharmaproteinen, Albumin-Präparaten oder Heparin existieren nach wie vor große Schwierigkeiten: Treten in diesen Präparaten Endotoxin-Verunreinigungen auf, bleibt gegenwärtig nur die Möglichkeit des Repressierens, um den Vorschriften von FDA, USP oder EP gerecht zu werden.

Um dieses aufwendige Verfahren zu vermeiden, das Produkt aber trotzdem seiner Bestimmung zuzuführen, wurde die Möglichkeit geprüft, verseuchte Produkte über chromatographische Sorbentien mit Endotoxin-spezifischen Liganden selektiv zu dekontaminieren. Auch dies brachte nicht den gewünschten Erfolg: Bisher beschriebene Affinitätssorbentien mit His, His, PMB als Liganden erwiesen sich trotz hoher bis sehr hoher Assoziationskonstanten bei hohen Endotoxin-Eingangskonzentrationen als nicht geeignet (9). Ferner wurde in Gegenwart von Proteinen konkurrierende Proteinadsorption beobachtet, die zu verringerten Endotoxin-Abreicherungsraten und teilweise hohen Proteinverlusten führte (insbesondere bei sauren Proteinen wie BSA).

Literatur

- (1) S.K. Sharma
Endotoxin detection and elimination in biotechnology
Biotechnol. Appl. Biochem. 8 (1986), 5 - 22
- (2) N. Haeffner-Cavaillon, J.M. Cavaillon, L. Szabó
Cellular receptors for endotoxin
Handbook of Endotoxins, Vol. 3: Biology of Endotoxins,
1 - 24
Elsevier Science Publishers B.V. (1985)
- (3) D.C. Morrison, J.L. Ryan
Endotoxins and disease mechanisms
Ann. Rev. Med. 38 (1987), 417 - 32

- (4) USP XXII Suppl. 5 (Nov. 1991)
- (5) K.C. Hou, R. Zaniewski
Depyrogenation by endotoxin removal with positively charged depth filter cartridge
J. Parenteral Sci. Tech., Vol. 44, No. 4 (1990), 204 - 209
- (6) CUNO Newsletter for Pharmaceuticals (Okt. 1995), S. 3
- (7) B.P. Smollich, D. Falkenhagen, J. Schneidewind, S. Mitzner, H. Klinkmann
Importance of endotoxins in high-flux dialysis
Nephrol. Dial. Transplant 3 (Suppl.) (1991) 83 - 85
- (8) E. Flindt
Pyrogenentfernung mittels Ultrafiltration
Memoscript CONCEPT-Symposium "Pyrogene II"
(Juni 1983), S. 54 - 60
- (9) F.B. Anspach, O. Hillbeck
Removal of endotoxins by affinity sorbents
J. Chromatogr. A 711 (1995), 81 - 92

Dieser Stand der Technik lässt sich erfindungsgemäß durch eine Mikrofiltrationsmembran zur Abtrennung von Endotoxinen aus flüssigen Medien, insbesondere Wasser, Proteinlösungen oder Parenteralien verbessern, wobei die Mikrofiltrationsmembran durch kovalent gebundene Liganden für Endotoxine gekennzeichnet ist, wobei die Liganden von einem Polymeren getragen werden, das auf der Membran aufgebracht ist.

Zur Membrantechnologie und auch Membranherstellung kann auf Ho & Sirkar (Herausgeber), *Membrane Handbook*, Verlag van Nostrand Reinhold, New York, 1992, verwiesen werden.

- Bei den kovalent gebundenen Liganden kann es sich um
- (a) einen endotoxin-spezifischen Liganden, vorzugsweise Histamin, Histidin, Polyethylenimin, Poly-L-lysin oder Polymyxin B und/oder
 - (b) einen per se nicht-endotoxin-spezifischen Liganden handeln, vorzugsweise Diaminohexan, Diethylaminoethyl oder Desoxycholat.

Bei dem Membranmaterial für die erfindungsgemäße Mikrofiltrationsmembran kann es sich um regenerierte Zellulose, Zelluloseacet, Polysulfon, Polyethylenvinylalkohol oder Polyamid handeln, insbesondere um Nylon.

Bei den Polymeren, das auf die erfindungsgemäße Mikrofiltrationsmembran aufgebracht ist, kann es sich um ein hydrophiles Polymere handeln, insbesondere um Dextran, Polyvinylalkohol oder modifizierte Zellulose, vorzugsweise Hydroxyethylzellulose.

Dieses hydrophile Polymere kann für sich wasserlöslich, in Wasser quellbar oder wasserunlöslich sein.

Das Polymere kann von der erfindungsgemäßen Mikrofiltrationsmembran mit Hilfe eines Spacers getragen werden. Auch die kovalent gebundenen Liganden können von einem Spacer getragen werden. Bei diesen Spacern kann es sich um Spacer handeln, die sich von Bisoxiran, Glutardialdehyd, Epihalogenhydrin oder Diisocyanat herleiten, gegebenenfalls nach oxidativer Aktivierung.

Zur Aktivierungs- und Immobilisierungsschemie, die auch auf endotoxin-spezifische Liganden und Spacer eingeht, sei beispielsweise auf Hermanson, Mallia & Smith, *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press Inc., San Diego, 1992, verwiesen.

Erfindungsgemäß werden also Mikrofiltrationsmembranen vorgesehen, die in geeigneter Weise oberflächenmodifiziert sind und aus Wasser und wässrigen Lösungen (Puffer, Proteinlösungen) Endotoxine entfernen. Die Oberflächenmodifikation kann im Aufbringen eines bifunktionellen kovalent gebundenen Spacers bestehen, der mit einem hydrophilen Polymeren umgesetzt wird, wobei unspezifische Wechselwirkungen der Membran, speziell mit Proteinen, reduziert werden. Das kovalent gebundene hydrophile Polymere kann mit endotoxin-spezifischen Liganden umgesetzt werden, gegebenen-

falls über einen weiteren Spacer. Zum Prinzip der Oberflächenmodifikation der Membran vergleiche man **Figur 1.**

Der Endotoxin-Abreicherungserfolg kann sich in Gegenwart von Proteinen als abhängig von der Nettoladung der Proteine erweisen. Durch Optimierung der Bedingungen (pH-Wert) können saure Proteine (wie BSA und Maus-IgG 1) vollständig dekontaminiert werden, und zwar ohne nennenswerte Verluste an Protein. Im Fall basischer Proteine (wie beispielsweise Lysozym und bFGF) lassen sich ebenfalls hohe Abreicherungen erzielen.

Polymer-gecoatete erfindungsgemäße Mikrofiltrationsmembranen mit kovalent gebundenen endotoxin-spezifischen Liganden können Endotoxine in einem Durchgang entfernen, und zwar auch aus hochbelasteten Lösungen (6000 EU ml^{-1}).

Vom Prinzip her sind die Membranen entsprechend **Figur 1.** aufgebaut. Zunächst wird über einen Spacer ein hydrophiles Polymer aufgebracht, das dann weiter, ggf. über einen Spacer, mit Endotoxin-spezifischen Liganden umgesetzt wird. Als Membranmaterialien kommen insbesondere infrage:

- Cellulose
- Polysulfon
- PEVA (Polyethylenvinylalkohol)
- Polyamide (speziell Nylon, wie z. B. N66)

Als Spacer eignen sich reaktive bifunktionale Verbindungen. Speziell geeignet sind:

- Bisoxiran
- Glutardialdehyd
- Epihalogenhydrine
- Diisocyanate

Zur Aktivierung der bei Verwendung von Bisoxiran und Epihalogenhydrin entstehenden vicinalen Diolbindung kann ggf. Oxidation durch Periodat angewandt werden, wobei eine Aldehydgruppe entsteht. Der an die Membran gebundene Spacer wird weiter umgesetzt mit hydrophilen Polymeren. Als solche kommen bevorzugt infrage:

- Dextran
- Polyvinylalkohol (PVA)
- Modifizierte Cellulosen, speziell Hydroxyethylcellulose (HEC)

Die weitere Reaktion erfolgt entweder direkt mit dem Endotoxin-spezifischen Liganden oder wiederum über die Vermittlung eines der oben angeführten Spacer, ggf. nach dessen oxidativer Aktivierung. Als Endotoxin-spezifische Liganden wirken (s. Liste der Abkürzungen): DAH, Him, His, PEI, PLL, PMB. Auch die üblicherweise nicht endotoxin-spezifischen Liganden wie DEAE und DOC erwiesen sich in der Membrankonfiguration als hochspezifisch bei gleichzeitig hoher Wiederfindung der Proteine.

Die Leistungsfähigkeit der entwickelten Membranen geht aus den angeführten Beispielen hervor. Die Endotoxin-Entfernung kann fast immer als vollständig bezeichnet werden. Sie liegt in der Regel unter 1 EU ml⁻¹, oft unterhalb der Nachweisgrenze mit dem LAL-Test.

An Kontrollmembranen (Nylon ohne Modifikation und mit aufgebrachtem hydrophoben Polymer mit oder ohne Spacer) ohne endotoxin-spezifischen Liganden wurde keine Endotoxinabreicherung erhalten.

Die neuen Membranen können eingesetzt werden zur Endotoxinentfernung aus Wasser und Parenteralia. Auch in Gegenwart von Proteinen werden gute Ergebnisse erzielt. Im Fall basischer Proteine ist allerdings zu berücksichtigen, daß Wechselwirkungen

der Proteine mit dem Endotoxin auftreten können, die zu einer endotoxischen Maskierung führen können. Proteingebundenes Endotoxin kann mit dem LAL-Test nicht eindeutig nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß nicht endgültig geklärt ist, ob proteingebundenes Endotoxin noch toxisch wirkt.

Die erfindungsgemäßen Membranen können vielseitig angewandt werden.

Medizinisch-pharmazeutischer Bereich:

- Hämodialyse.
- Unbedenkliche Infusions- und Injektionslösungen (Parenteralia).
- Sichere Diagnostika (z. B. Antikörper).

In der Biotechnologie:

- Herstellung von Pharmprodukten.
- Endotoxin-Abreicherung in Prozesswasser und Rohstoffen.
- Dekontaminierung von Produkten (aufwand für Prozessierung entfällt).

Methoden

1. Herstellung der Membranen

An Mikrofiltrationsmembranen auf Nylon-Basis (bevorzugt 0,45 µm oder größer) werden hydrophile Polymere, insbesondere Dextran, Polyvinylalkohol und Hydroxyethylcellulose kovalent gebunden. Im nächsten Schritt werden an die aufgebrachten Polymere endotoxin-spezifische Liganden immobilisiert. Figur 1 illustriert den Aufbau der Membranen.

1.1. Membran-coating am Beispiel von Dextran:

Die Nylon-Membranen wurden zunächst mit Bisoxiran aktiviert:
Hierzu wurden sie sechzehn Stunden bei 80 °C in einer Mischung

von 9 ml Bisoxiran, 1 ml Ethanol und 1 ml 25 mM Natriumcarbonat-Puffer (pH 11) geschüttelt (Figur 2a). Nach gründlichem Waschen wurde je eine Membran mit 5 ml einer 20-proz. Dextran 40000-Lösung (pH 11) fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Figur 2b). Anschließend wurden die Membranen 14 Stunden bei 120 °C getrocknet. Um unspezifisch gebundenes Dextran zu entfernen, wurden die Membranen dreimal mit 0,1 M Natronlauge und weitere dreimal mit Wasser gewaschen.

Wie Figur 3 zeigt, zeichnen sich die gecoateten Membranen durch signifikant geringere unspezifische Wechselwirkungen - ausgedrückt durch adsorbierte Menge Hämoglobin - aus.

Aus der Figur 3 geht auch hervor, daß mit einem einfachen Dextran-coating nicht der gleiche Effekt erreicht werden kann wie mit PVA und HEC. Durch einen zweiten Layer kann weitere Verbesserung erzielt werden, während ein dritter Layer nur noch geringfügige Auswirkungen hat. Dextran wurde daher immer als Doppel-coating eingesetzt.

1.2. Immobilisierung von endotoxin-spezifischen Liganden

Die Liganden PLL, PMB und PEI wurden entweder direkt an die periodat-aktivierten Coating-Polymeren oder nach Inkorporation eines periodat-oxidierbaren Spacers (Bisoxiran) immobilisiert. Das Vorgehen ist beispielhaft in Figur 4 dargestellt. DEAE wurde ohne Spacer direkt an die Matrices gekoppelt, die anderen niedermolekularen Liganden wurden über Epibromhydrin gebunden.

1.2.1 PEI-Immobilisierung über Bisoxiran

Zur Aktivierung wurden die mit hydrophilen Polymeren gecoateten Membranen drei Stunden bei Raumtemperatur in einer Mischung aus 100 mg Natriumborhydrid, 5 ml Bisoxiran und 45 ml 1 M Natronlauge inkubiert. Nach Hydrolyse des freien Oxiranringes (30 Minuten Inkubation bei pH 2,5) und Periodatoxidation des erhaltenen vicinalen Diols (90 Minuten Inkubation in 0,2 M Natrium-

periodat) wurden die Membranen zwei Stunden mit einer Lösung von 0,5 g PEI (MW 50000) in 0,1 M Phosphatpuffer, die auf pH 8 eingestellt wurde, bei Raumtemperatur umgesetzt, so daß sich der in **Figur 1** gezeigte Aufbau ergibt. Abschließend wurde mit 1 M Natriumchlorid-Lösung und Wasser gewaschen.

1.2.2. Histidin-Immobilisierung

Histidin wurde über DAH an epibromhydrin-aktivierte gecoatete Membranen immobilisiert. Epibromhydrin-Aktivierung wurde wie für Bisoxiran beschrieben durchgeführt. Immobilisiertes DAH wurde durch 8-minütige Reaktion mit einer Mischung von 5 ml Epibromhydrin und 5 ml 4 M Natronlauge bei 90 °C aktiviert und sofort bei 80 °C mit L-Histidin umgesetzt (0,5 g L-Histidin in 20 ml Wasser, pH 12). Die fertige Membran wurde mit 1 M Natriumchlorid und Wasser gewaschen.

Entsprechende Vorschriften wurden angewandt für das Coating mit anderen Polymeren und die kovalente Bindung mit den anderen endotoxin-spezifischen Liganden.

2. Abreicherungsexperimente

Alle Untersuchungen zum Adsorptionerverhalten von Endotoxinen an den Membranen wurden bei Raumtemperatur im Dead-end-Modus durchgeführt.

Je eine Membranscheibe wurde am Boden einer Ultrafiltrationszelle (Membranfläche 13,4 cm²) fixiert und mit 30 % ethanolischer 0,1 M Natronlauge, 1,5 M Natriumchlorid-Lösung und pyrogenfreiem Wasser gewaschen, um Endotoxin-Spuren zu entfernen. Nach Equilibrierung der Membran wurden jeweils 20 ml kontaminierte Lösung mit einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml/min durch die Membran filtriert. Das Filtrat wurde gesammelt und im LAL-Test untersucht.

3. Endotoxintest

Zur Endotoxin-Quantifizierung in den Ausgangslösungen und Filtraten wurde ein chromogener Limulus Amöbozyt Lysat Test (LAL-Test) eingesetzt. Dieser Test beruht darauf, daß Endotoxin die Freisetzung des Chromogens p-Nitroanilin induziert, wobei zwischen der freigesetzten Menge p-Nitroanilin und der vorliegenden Endotoxin-Konzentration im Bereich 0 bis 1,2 EU/ml ein linearer Zusammenhang besteht. Aus der photometrischen p-Nitroanilin-Bestimmung kann mit Hilfe einer Kalibriergeraden (Standard-Endotoxin *E. coli* 0111:B4) auf die Endotoxin-Konzentration der Proben geschlossen werden.

Der LAL-Test wurde in Europa 1985 von der Europäischen Arzneibuch-Kommission zur Prüfung auf Endotoxine eingeführt undersetzt seit 1989 auch in der Monographie "Wasser für Injektionszwecke" den Kaninchen-Test.

Anwendungsbeispiele

1. (Fig. 5) Abreicherung aus hochbelasteten Pufferlösungen
Feed: 20 ml 20 mM Phosphatpuffer (pH 7) mit 6000 EU/ml versetzt

Die mit -d gekennzeichneten Membranen stellen Membranen dar, bei denen auf Inkorporation eines Spacers verzichtet wurde.

2. (Fig. 6 bis 7) Abreicherung aus Endotoxin-angereicherten BSA-Lösungen
Feed: 20 ml 20 mM Phosphatpuffer (pH 4,66) mit 1 mg/ml BSA und 6610 EU/ml versetzt

Proteinwiederfindung BSA

3. (Fig. 8) Abreicherung aus Handels-BSA

Feed: 20 ml 20 mM Phosphatpuffer (pH 4,66) mit 1 mg/ml BSA
Endotoxinkonzentration 65 EU/ml

4. (Fig. 9 bis 10) Abreicherung aus Handels-Lysozym

Feed: 20 ml 20 mM Phosphatpuffer (pH 7) mit 1 mg/ml Lysozym
Endotoxinkonzentration 134 EU/ml

Proteinwiederfindung Lysozym

5. (Fig. 11 bis 12) Abreicherung aus MAX 16 H 5

Feed: 20 ml 20 mM Phosphatpuffer (pH 5,5) mit 3 mg/ml Protein
Endotoxinkonzentration 62,5 EU/ml

Proteinwiederfindung IgG

6. Abreicherung aus bereits aufgereinigtem bFGF

Feed: 5 ml bFGF, das 9 EU/ml enthielt

Es wurde das Abreicherungsverfahren einer PEI-Membran untersucht. Im Filtrat waren noch 0,202 EU/ml nachweisbar.

7. Abreicherung aus Milli-Q-Wasser, das mit Endotoxin versetzt wurde

Feed: 1 l Wasser mit 270 EU/ml versetzt

Zur Abreicherung wurden eine PEI- und eine DAHHis-Membran eingesetzt.

PEI-Filtrat: < 0,015 EU/ml

DAHHis-Filtrat: 0,07 EU/ml

Verwendete Abkürzungen

BSA	Rinderserumalbumin
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
DAH	Diaminohexan
DEAE	Diethyl-aminoethyl
DEX	Dextran
DEX/2	bezeichnet eine Membran, die zweimal nacheinander mit Dextran gecoatet wurde
DEX/3	bezeichnet eine Membran, die dreimal nacheinander mit Dextran gecoatet wurde
DOC	Desoxycholat
EP	Europäische Pharmacopö
EU	Endotoxin-Unit
FDA	Food and drug administration
HEC	Hydroxyethylcellulose
Him	Histamin
His	Histidin
MW	Molekulargewicht
N66	unbehandelte Nylon-Membran
PEI	Polyethylenimin
PLL	Poly-L-Lysin
PMB	Polymyxin B
PVA	Polyvinylalkohol
USP	US Pharmacopö

Patentansprüche

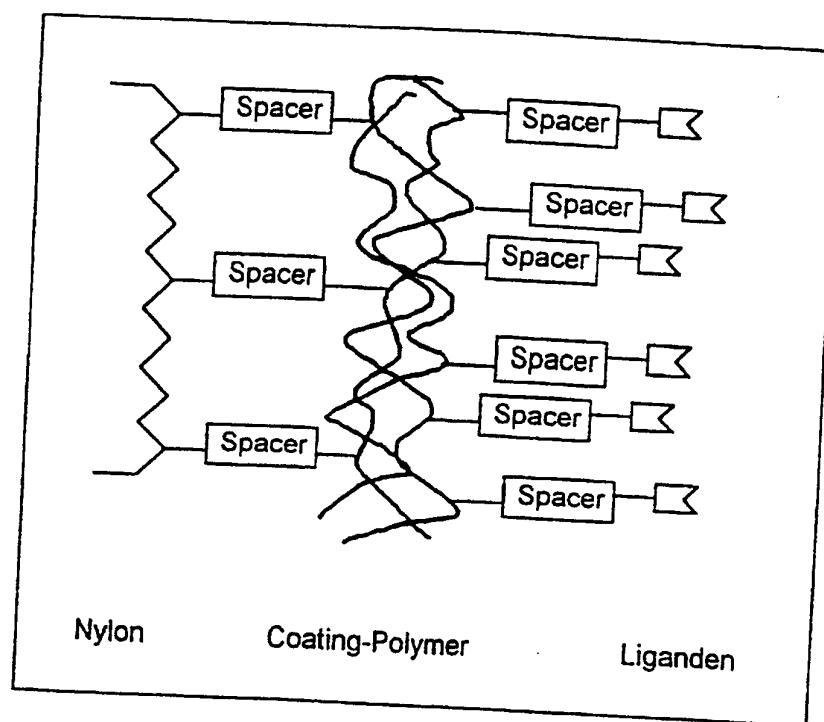
1. Mikrofiltrationsmembran zur Abtrennung von Endotoxinen aus flüssigen Medien, insbesondere Wasser, Proteinlösungen oder Parenteralien, gekennzeichnet durch kovalent gebundene Liganden für Endotoxine, wobei die Liganden von einem Polymeren getragen werden, das auf der Membran aufgebracht ist.
2. Mikrofiltrationsmembran nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch
 - (a) einen endotoxin-spezifischen Liganden, vorzugsweise Histamin, Histidin, Polyethylenimin, Poly-L-lysin oder Polymyxin B und/oder
 - (b) einen per se nicht-endotoxin-spezifischen Liganden, vorzugsweise Diaminohexan, Diethylaminoethyl oder Desoxycholat.

3. Mikrofiltrationsmembran nach Anspruch 1 oder 2, gekennzeichnet durch regenerierte Zellulose, Zelluloseacetat, Polysulfon, Polyethylenvinylalkohol oder Polyamid, insbesondere Nylon als Membranmaterial.
4. Mikrofiltrationsmembran nach einem der vorhergehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch ein hydrophiles Polymeres, insbesondere Dextran, Polyvinylalkohol oder modifizierte Zellulose, vorzugsweise Hydroxyethylzellulose.
5. Mikrofiltrationsmembran nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das hydrophile Polymere für sich wasserlöslich oder wasserunlöslich ist.
6. Mikrofiltrationsmembran nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Polymere von der Membran mit Hilfe eines Spacers getragen wird.
7. Mikrofiltrationsmembran nach Anspruch 6, gekennzeichnet durch einen sich von Bisoxiran, Glutardialdehyd, Epihalogenhydrin oder Diisocyanat herleitenden Spacer.
8. Mikrofiltrationsmembran nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Liganden von dem Polymeren mit Hilfe eines Spacers getragen werden.
9. Mikrofiltrationsmembran nach Anspruch 8, gekennzeichnet durch einen sich von Bisoxiran, Glutardialdehyd, Epihalogenhydrin oder Diisocyanat herleitenden Spacer, gegebenenfalls nach oxidativer Aktivierung.

10. Verwendung einer Mikrofiltrationsmembran gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche zum Entfernen von Endotoxinen aus flüssigen Medien, insbesondere aus Wasser, Proteinlösungen oder Parenteralien.

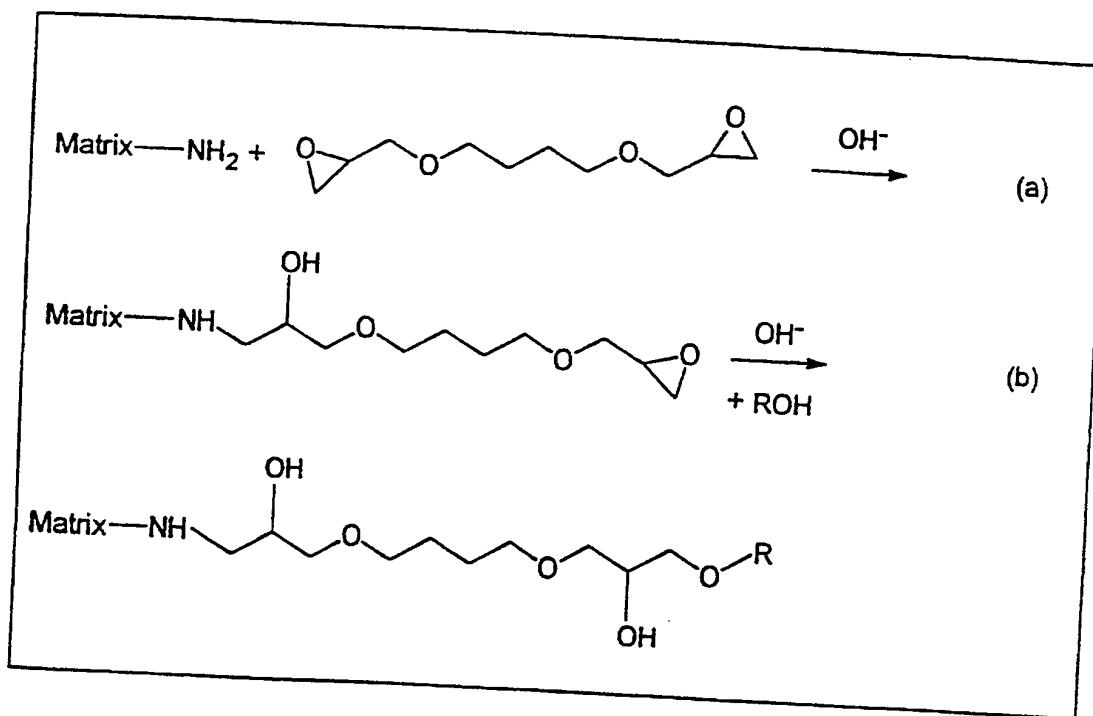
1/9

Abb. 1: Schematischer Aufbau der gecoateten Membranen



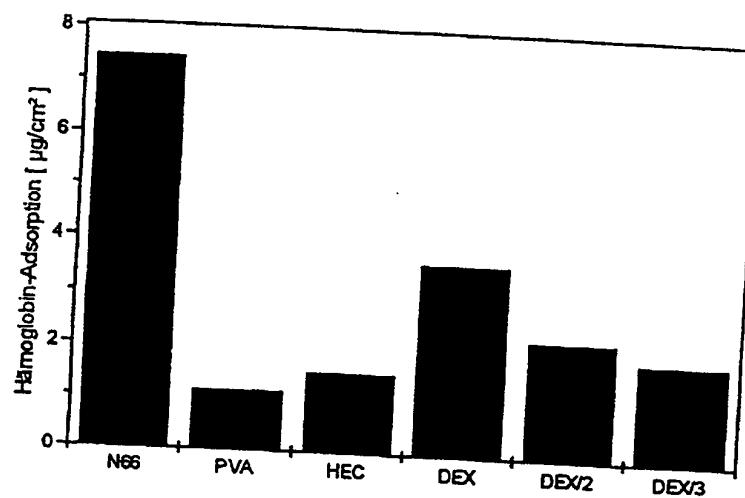
2/9

Abb. 2 : Aktivierung der Matrix an terminalen Stickstoffgruppen (a) und Kopplung eines Polymers ROH (b)



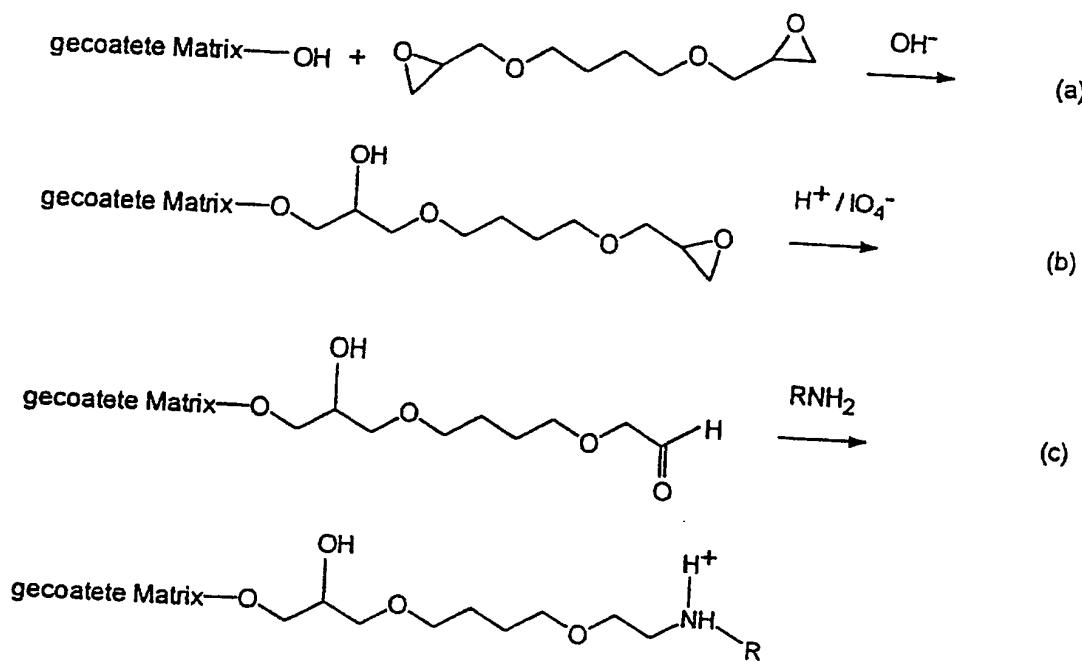
3/9

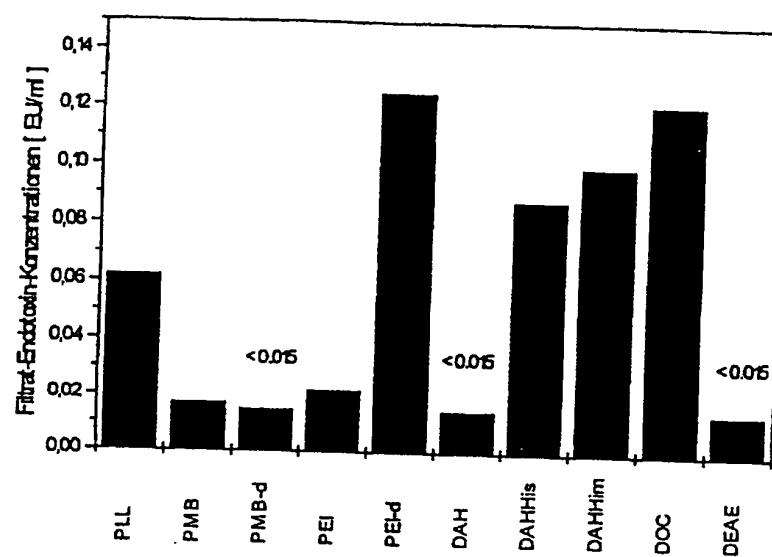
Abb. 3 : Unspezifische Proteinadsorption an verschiedenen Polymergecoateten Membranen



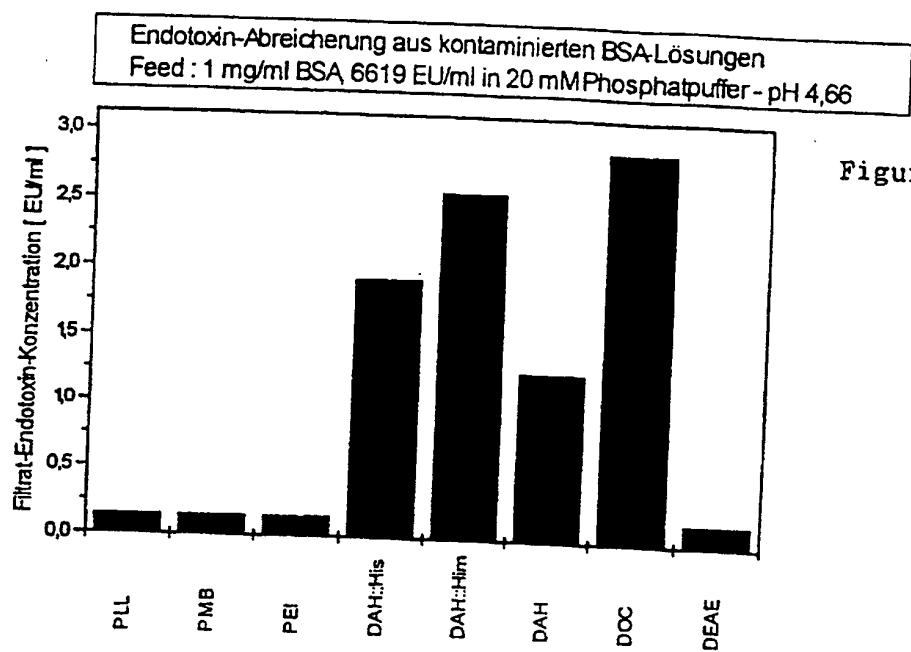
4/9

Abb. 4 : Aktivierung der gecoateten Membranen an freien Hydroxylgruppen (a), Hydrolyse und Periodat- Spaltung (b), Kopplung von Stickstoff-Liganden (c).

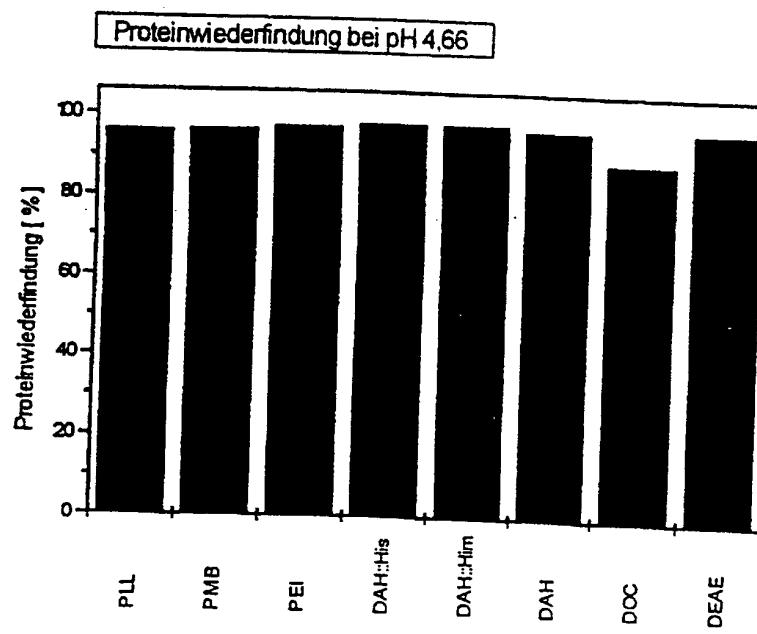




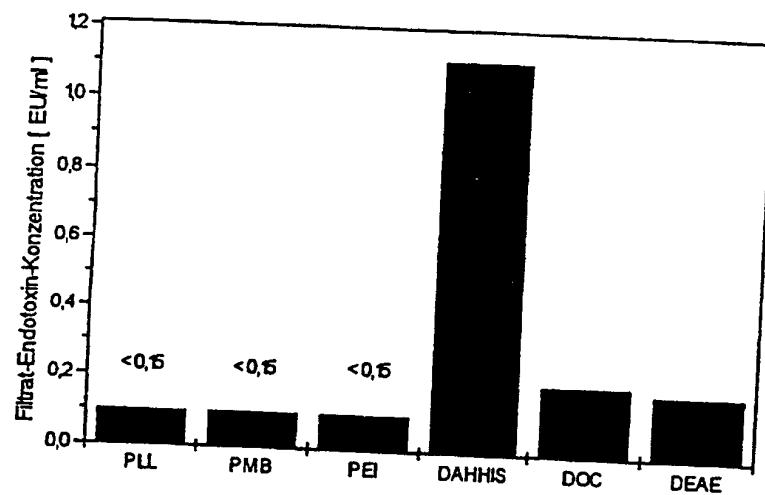
Figur 5



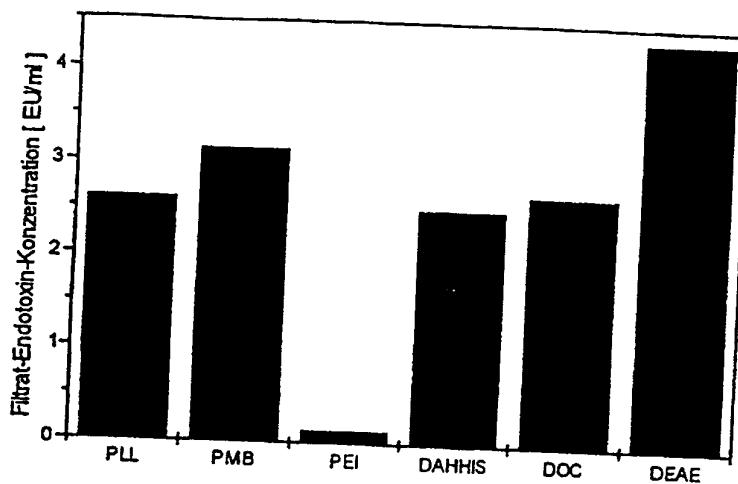
Figur 6



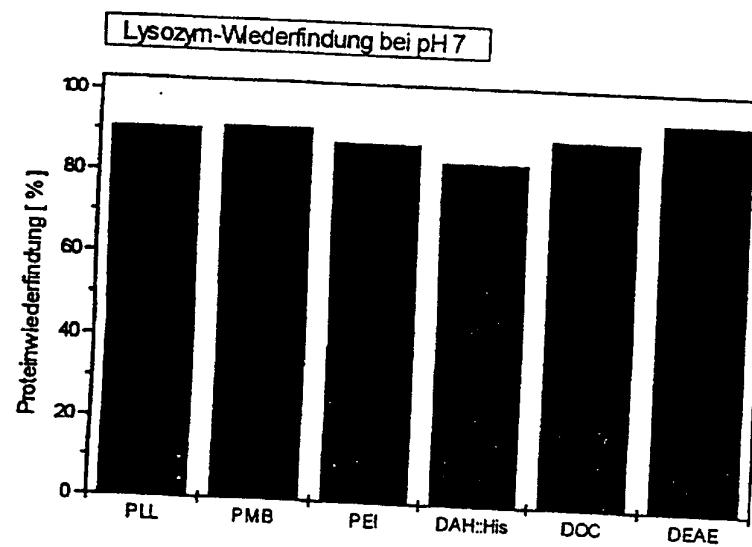
Figur 7



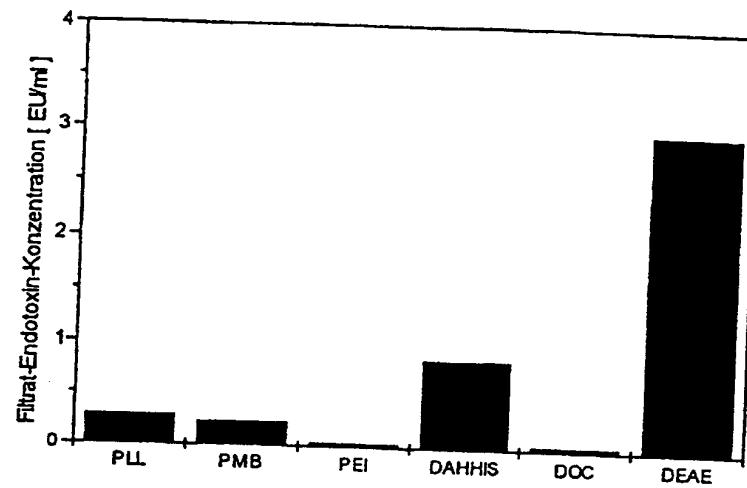
Figur 8



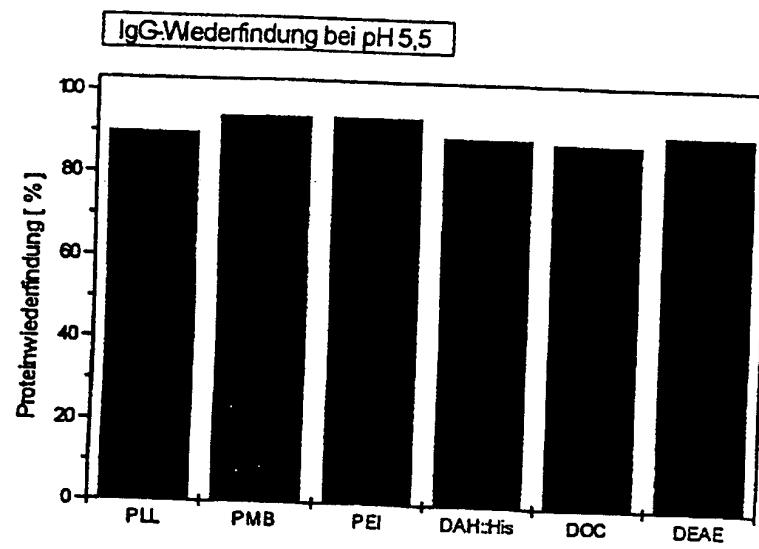
Figur 9



Figur 10



Figur 11



Figur 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/01225

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6	B01D69/02	B01D61/14	B01D67/00	B01J20/32	B01D15/00
-------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 B01D B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 42 09 988 A (D.FALKENHAGEN ET AL) 4 March 1993 see abstract; claims 1,5 ---	1-3,10
A	GB 2 092 470 A (TANABE SEIYAKU CO. LTD.) 18 August 1982 see the whole document ---	1-10
A	EP 0 418 517 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES) 27 March 1991 see examples ---	1-3,10
A	EP 0 312 104 A (TANABE SEIYAKU CO.LTD) 19 April 1989 see page 5, line 35-44 -----	1

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- '&' document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search Date of mailing of the international search report

19 June 1997

07.07.97

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cordero Alvarez, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 97/01225

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 4209988 A	04-03-93	DE 4113602 A		29-10-92
GB 2092470 A	18-08-82	DE 3204544 A FR 2499429 A JP 1588983 C JP 2014325 B JP 57183712 A JP 1656109 C JP 3007681 B JP 63118301 A SE 461505 B SE 8200715 A US 4381239 A		02-09-82 13-08-82 19-11-90 06-04-90 12-11-82 13-04-92 04-02-91 23-05-88 26-02-90 11-08-82 26-04-83
EP 418517 A	27-03-91	JP 3068435 A AT 107537 T CA 2022924 A CN 1049295 A,B DE 69010124 D DE 69010124 T ES 2058701 T US 5032281 A AT 115888 T CA 2031599 A CN 1053046 A,B DE 69015334 D DE 69015334 T EP 0431593 A ES 2068975 T JP 3238004 A US 5136032 A		25-03-91 15-07-94 10-02-91 20-02-91 28-07-94 13-10-94 01-11-94 16-07-91 15-01-95 08-06-91 17-07-91 02-02-95 17-08-95 12-06-91 01-05-95 23-10-91 04-08-92
EP 312104 A	19-04-89	JP 1194991 A JP 8029316 B CA 1330049 A DE 3887812 D DE 3887812 T ES 2063013 T US 4909942 A		04-08-89 27-03-96 07-06-94 24-03-94 19-05-94 01-01-95 20-03-90

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 97/01225

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES					
IPK 6	B01D69/02	B01D61/14	B01D67/00	B01J20/32	B01D15/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Rechercherter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)
IPK 6 B01D B01J

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 42 09 988 A (D.FALKENHAGEN ET AL) 4.März 1993 siehe Zusammenfassung; Ansprüche 1,5 ---	1-3,10
A	GB 2 092 470 A (TANABE SEIYAKU CO. LTD.) 18.August 1982 siehe das ganze Dokument ---	1-10
A	EP 0 418 517 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES) 27.März 1991 siehe Beispiele ---	1-3,10
A	EP 0 312 104 A (TANABE SEIYAKU CO.LTD) 19.April 1989 Siehe Seite 5, Zeile 35-44 -----	1

<input type="checkbox"/>	Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :		
'A'	Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist	'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
'E'	älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist	'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
'L'	Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)	'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
'O'	Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht	'&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
'P'	Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	

2

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
19.Juni 1997	7.07.97
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Cordero Alvarez, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inte	nales Aktenzeichen
	PCT/EP 97/01225

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 4209988 A	04-03-93	DE 4113602 A	29-10-92
GB 2092470 A	18-08-82	DE 3204544 A FR 2499429 A JP 1588983 C JP 2014325 B JP 57183712 A JP 1656109 C JP 3007681 B JP 63118301 A SE 461505 B SE 8200715 A US 4381239 A	02-09-82 13-08-82 19-11-90 06-04-90 12-11-82 13-04-92 04-02-91 23-05-88 26-02-90 11-08-82 26-04-83
EP 418517 A	27-03-91	JP 3068435 A AT 107537 T CA 2022924 A CN 1049295 A,B DE 69010124 D DE 69010124 T ES 2058701 T US 5032281 A AT 115888 T CA 2031599 A CN 1053046 A,B DE 69015334 D DE 69015334 T EP 0431593 A ES 2068975 T JP 3238004 A US 5136032 A	25-03-91 15-07-94 10-02-91 20-02-91 28-07-94 13-10-94 01-11-94 16-07-91 15-01-95 08-06-91 17-07-91 02-02-95 17-08-95 12-06-91 01-05-95 23-10-91 04-08-92
EP 312104 A	19-04-89	JP 1194991 A JP 8029316 B CA 1330049 A DE 3887812 D DE 3887812 T ES 2063013 T US 4909942 A	04-08-89 27-03-96 07-06-94 24-03-94 19-05-94 01-01-95 20-03-90